DOI: 10.21870/0131-3878-2019-28-4-96-107

УДК 616-006.6:615.831:599.323.4

Фотодинамическая активность липосомального борированного хлорина е6

Бурмистрова Н.В., Дрожжина В.В., Каплан М.А., Южаков В.В., Бандурко Л.Н.,
Цыганова М.Г., Иванов С.А., Архипова Л.М., Абрамова О.Б.

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Цель исследования – изучение эффективности воздействия фотодинамической терапии (ФДТ) с применением нового отечественного фотосенсибилизатора (ФС) липосомального борированного хлорина е6 после его внутривенного введения. В качестве экспериментальной модели опухоли служила карцинома Эрлиха мышей. Для определения оптимального времени проведения лазерного облучения была изучена кинетика тканевого распределения ФС в опухолевой и здоровой тканях бедра. Эффективность терапии оценивали по проценту животных с полной регрессией опухоли (ПР%), по торможению роста опухоли (ТРО%) и по коэффициенту абсолютного прироста (К) у животных с продолженным ростом опухоли по сравнению с контролем. Контролем служили мыши-опухоленосители без воздействия. Терапевтический потенциал ФДТ по девитализации опухолевых клеток верифицировали путём гистологических исследований. Установлено, что после ФДТ, проведённой в оптимальные сроки после введения ФС, наблюдалась полная регрессия опухоли у 100% животных к 21 суткам от начала исследования при дозе ФС 1,25 мг/кг, плотности энергии 150 Дж/см² и плотности мощности 0,51 Вт/см² лазерного излучения. При микроскопическом исследовании тканей в зоне лазерного воздействия только у одного животного был выявлен рецидив новообразования, в то время как визуально была определена регрессия карциномы Эрлиха.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, карцинома Эрлиха, мыши, липосомальный борированный хлорин е6, динамика накопления фотосенсибилизатора, индекс контрастности, лазер, регрессия опухоли, патоморфология.

Введение

Рост заболеваемости злокачественными новообразованиями требует поиска новых способов терапии. Возможности современной онкологии значительно расширились с появлением фотодинамической терапии (ФДТ) – высокоэффективного метода локального лечения поверхностных злокачественных опухолевых заболеваний с использованием современных полупроводниковых лазеров и препаратов-сенсибилизаторов, которые селективно накапливаются в атипичных клетках и опухолевых тканях [1-3]. Фотосенсибилизатор (ФС), накопившийся в опухоли, поглощает свет и производит образование синглетного кислорода, который разрушает клетки. Генерируемые ФС активные формы кислорода инициируют окислительные деструктивные реакции в биомолекулах и в биоструктурах. Кроме прямого цитотоксического воздействия ФДТ на опухолевые клетки важную роль в деструкции новообразования играют: нарушение кровоснабжения за счёт повреждения эндотелия кровеносных сосудов опухолевой ткани; цитокиновые реакции, обусловленные стимуляцией продукции фактора некроза опухоли, активацией макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов [4-8]. Разрушение клеток и эндотелия сосудов опухоли служит пусковым фактором развития иммунных реакций, что приводит к иммунологическому уничтожению трансформированной клетки [9]. Прогресс ФДТ связан с разработкой новых и оптимизацией уже существующих способов фотодинамического воздействия на злокаче-

Бурмистрова Н.В. – зав. лаб., к.м.н.; Дрожжина В.В.* – научн. сотр., Каплан М.А. – зав. отд., д.м.н., проф.; Южаков В.В. – зав. лаб., к.м.н.; Бандурко Л.Н. – вед. научн. сотр., к.м.н.; Цыганова М.Г. – научн. сотр.; Иванов С.А. – директор, д.м.н., проф.; Архипова Л.М. – мл. научн. сотр.; Абрамова О.Б. – научн. сотр. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

*Контакты: 249035, Калужская обл., Обнинск, ул. Королёва, 4. Тел.: + 7 (903) 524-53-13; e-mail: drozhzhina_1949@mail.ru.

венные неоплазии различных морфологических типов и локализаций, а также созданием новых более эффективных и безопасных ФС, обеспечивающих достаточный терапевтический эффект при минимальном повреждении окружающих здоровых тканей и отсутствие общетоксического действия. Большой интерес в качестве ФС вызывают производные хлорофилла [10-12]. Также ведутся активные работы по созданию липосомальных форм хлориновых ФС с расширенным спектром их возможностей [13-16]. Они проявляют на порядок большую световую токсичность при отсутствии темновой токсичности, повышают селективность накопления в опухоли, что увеличивает эффективность ФДТ на более малых дозах ФС.

Для эффективного проведения ФДТ была изучена кинетика тканевого распределения ФС в опухоли и здоровой ткани бедра. Данное исследование с помощью спектрального анализа на установке ЛЭСА-01-Биоспек необходимо для определения оптимального времени проведения ФДТ. Этот метод позволяет количественно определить уровень накопления сенсibilизатора в различных тканях *in vivo* и контролировать параметры ФДТ во время самой процедуры. Использование компьютерной программы, обрабатывающей сигнал со спектрометра, позволяет в реальном масштабе времени определять степень накопления ФС в исследуемой ткани, наблюдать спектры, измерять их параметры, а также сохранять в памяти компьютера выбранные спектры, их отношения, определять другие параметры спектров. Основным преимуществом методов спектрального анализа тканей *in vivo* является его неинвазивность, что позволяет получать информацию о состоянии тканей, не оказывая влияния на динамику различных биологических процессов. Другим преимуществом оптического анализа тканей является возможность обработки данных в реальном масштабе времени, а также корректировки параметров терапевтического процесса в соответствии с полученной информацией [17, 18].

Цель данного исследования – изучение эффективности ФДТ с оригинальным ФС на основе хлорина е6 – липосомальной формы борированного хлорина е6 у мышей с карциномой Эрлиха.

Материалы и методы

Работа выполнена с соблюдением международных рекомендаций (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (CIOMS, Geneva, 1985) на 57 беспородных мышках-самках весом 20-25 г с имплантированной карциномой Эрлиха (КЭ) мышей [19]. Штамм КЭ получен из банка опухолевых материалов РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Для воспроизведения солидной опухоли асцитическую жидкость с суспензией опухолевых клеток от мышей-доноров вводили подкожно с внешней стороны левого бедра. В опыт мышей брали на 4 день, когда объёмы опухолей составляли 0,042-0,062 см³ (у 2-х животных объёмы опухолей были равны 0,11 см³). Перед перевивкой опухоли шерстный покров выстригали и депилировали. Контролем служили животные-опухоленосители без какого-либо воздействия.

В качестве фотосенсибилизатора изучали липосомальный борированный хлорин е6, который вводили внутривенно в хвостовую вену (рис. 1).

ФС «Борированный хлорин е6» был синтезирован в Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН. В ГОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова на кафедре фармацевтической технологии и фармакологии была разработана и синтезирована новая лекарственная форма «Борхлорин липосомальный лиофилизат» как мембраноактивный фотосенсибилизатор на основе борированного хлорина е6 для фотодинамической терапии опухолей.

Рис. 1. Структурная формула борированного хлорина еб.

Состав липосомальной формы: борхлорин/лецитин 1:200 и лецитин/холестерин 3:1, который обеспечивал включение борхлорина на уровне 99%, ПЭГ-ДГФА, значение pH 6,9, приемлемый размер липосом 185 ± 10 нм. В качестве растворителя для гидратации липидной плёнки используют воду для инъекций, раствор криопротектора (раствор сахарозы при молярном соотношении лецитин:сахароза 1:5) и изотонический раствор натрия хлорида.

При преобразовании фотосенсибилизаторов путём присоединения борных кластеров к тетрапиррольному макроциклу значительно оптимизируются фотоактивные свойства препарата при проведении ФДТ. Механизм воздействия борированных производных хлорина еб – благодаря свойствам борного полиэдра происходит глубокое проникновение в липидный бислой мембраны клеток, что обеспечивает необратимое повреждение опухолевых клеток благодаря индукции первичного некроза.

I. Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани

Уровень накопления ФС оценивали по интенсивности флуоресценции в условных единицах. Измерение уровня накопления ФС в опухолевой и здоровой тканях изучали с помощью спектрофлуоресцентного метода на комплексе ЛЭСА-01-Биоспек (Россия). Датчики подводили к коже над опухолью и в трёх точках под прямым углом к объекту (центр, периферия 1 и периферия 2). Накопление в здоровой ткани определяли на здоровой ткани бедра с опухолью (контроль 1) и на противоположном бедре (контроль 2). Время экспозиции составляло 1-2 с. В различные сроки после введения ФС у каждого животного измеряли спектры опухолевой и здоровой тканей. Первое измерение проводили до введения препарата (0 ч), а затем через: 15; 30; 45 мин; 1 ч; 1 ч 15 мин; 1,5 ч; 2 ч; 2 ч 30 мин; 3 ч; 96; 120 и 144 ч. Для суждения о селективности накопления ФС в опухоли по отношению к здоровой ткани рассчитывали индекс контрастности (опухоль/здоровая ткань).

II. Изучение эффективности ФДТ

Исследование проведено на двух группах животных с разными дозами ФС и с различной плотностью энергии (E) – 150 и 100 Дж/см², а плотность мощности (Ps) была одинаковой – 0,51 Вт/см²:

1 группа – доза ФС 1,25 мг/кг, E=150 Дж/см²;

2 группа – доза ФС 2,5 мг/кг, E=100 Дж/см².

Контроль – мышцы-опухоленосители без какого-либо воздействия.

Животные при облучении находились под общим тиопенталовым наркозом. Животных наркотизировали путём внутрибрюшинного введения тиопентала натрия (1,25% раствор) – 0,06 мл на мышку (20 г).

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «Аткус-2» производства ЗАО «Полупроводниковые приборы» (Санкт-Петербург) с длиной волны излучения 662 ± 1 нм. Диаметр светового пятна составлял 1,5 см.

Объём опухоли измеряли до проведения ФДТ (V_0) и на 3, 7, 10, 14, и 21 сутки (V_t) после терапии.

Эффективность ФДТ оценивали по рекомендации Фармкомитета по предклинической апробации препаратов [20]:

1. По коэффициенту абсолютного прироста опухоли (K):

Для этого сначала вычисляли объёмы опухолей по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi \cdot d_1 \cdot d_2 \cdot d_3, \quad (1)$$

где d_1 , d_2 , d_3 – 3 взаимно перпендикулярные диаметра опухоли; V – объём опухоли в см³.

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) рассчитываем по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \quad (2)$$

где V_0 – объём опухоли до воздействия; V_t – объём опухоли на определённый срок наблюдения.

2. По проценту животных в группе с полной регрессией (ПР%) опухоли ($K=-1,00$) по критерию отсутствия видимой и пальпируемой опухоли.

III. Гистологическая оценка эффективности ФДТ

Мышей-опухоленосителей выводили из опыта на 21 сутки после ФДТ путём цервикальной дислокации. Опухоли выделяли под тиопенталовым наркозом. Ткань опухоли в виде пластинок толщиной 3-4 мм, ориентированных вдоль длинной оси, фиксировали 24 ч в жидкости Буэна. После стандартной гистологической проводки на гистопроцессоре Leica TPI020 ориентированные фрагменты тканей заключали в парафиновую среду Гистомикс на станции заливки HistoStar (Thermo Scientific). Для морфологических исследований срезы толщиной в 5 мкм, полученные на микротоме Leica RM2235, после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином (БиоВитрум). Гистологические срезы изучали под микроскопом Leica DM 1000 с микроротосъёмкой на цифровую камеру Leica ICC50 HD.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в компьютерной программе «Statistica» непараметрическими методами для независимых групп (описательная статистика, значимость различий признаков). Статистическую значимость различий сравниваемых признаков в группах проводили с помощью непараметрического метода U теста Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$, что соответствует 95% вероятности безошибочного прогноза.

Результаты исследования

1. Изучение динамики накопления ФС в опухоли и здоровой ткани

Уровень и селективность накопления ФС в опухоли, а также скорость его выведения из нормальной ткани являются важнейшими характеристиками для ФДТ. Они влияют как на эффективность метода, так и на вероятность снижения побочных эффектов. ФС вводили внутривенно в дозе 2,5 мг/кг массы животного. Определён спектр флуоресценции поглощения препарата липосомального борированного хлорина е6 (рис. 2).

Рис. 2. Спектр флуоресценции липосомального борированного хлорина е6.

Рис. 3. Уровень накопления и индекс контрастности липосомального борированного хлорина е6 в опухоли и здоровой ткани мышей после его внутривенного введения.

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что через 30 мин после внутривенного введения липосомального борированного хлорина е6 происходит резкое увеличение уровня накопления его как в опухоли, так и в здоровой ткани. Максимальная интенсивность флуоресценции ФС наблюдалась через 1 ч (6,25 у.ед. по сравнению с исходным уровнем 0,5 у.ед.), затем через 1 ч 15 мин начинается медленное снижение уровня накопления ФС в тканях. В период от 0,5 ч до 1 ч 15 мин наблюдалось достоверное увеличение уровня накопления ФС ($p < 0,001$) по срав-

нению с исходными величинами. Через 0,5 ч повышался индекс контрастности, достигая максимума через 1 ч 15 мин.

Таким образом, оптимальное время проведения лазерного облучения через 0,5 ч – 1 ч 15 мин после внутривенного введения липосомального борированного хлорина еб.

II. Изучение эффективности ФДТ

На 4 сутки после перевивки опухоли формировалась солидная опухоль. На данный срок животным проведена ФДТ.

В двух группах через 3 дня после ФДТ в области облучения лазером наблюдался отёк тканей. На 7-10 сутки образовался плотный струп с чёткой демаркационной линией между окружающей кожей и некротизированной тканью новообразования и отсутствие видимой и пальпируемой опухоли.

У животных 1-й опытной группы до 21 суток после терапии наблюдался струп на месте облучения и визуализировалась полная регрессия опухоли у 100% животных (доза ФС 1,25 мг/кг, $E=150 \text{ Дж/см}^2$, $Ps=0,51 \text{ Вт/см}^2$) (табл. 1).

У особей 2-й опытной группы на этот срок наблюдений после терапии полная регрессия опухоли отмечена у 66,7% мышей. У остальных животных на третьей неделе после лечения возобновился рост опухоли по периферии области облучения, но коэффициент прироста опухоли на 21 сутки достоверно ниже ($p<0,001$) по сравнению с контролем. Ингибирующий эффект ТРО% составил 91,3%. Но, даже при значительной противоопухолевой активности, данные параметры проведения опыта (доза ФС 2,5 мг/кг, $E=100 \text{ Дж/см}^2$, $Ps=0,51 \text{ Вт/см}^2$) оказались менее эффективными, чем группа 1 (табл. 1).

В контрольной группе наблюдался прогрессирующий рост опухоли (табл. 1).

III. Результаты патоморфологического исследования

Контрольная группа. На 25-е сутки после перевивки у мышей контрольной группы паренхима карциномы Эрлиха просматривалась в основном в периферических участках в виде тяжёлой неравномерной ширины (рис. 4А). У некоторых животных крупные опухоли прорастали мышечную ткань до бедренной кости и кожные покровы иногда подвергались аноксической деструкции с формированием на поверхности струпов. В зонах инвазии опухолевые клетки диссоциированы друг от друга (рис. 4Б). В полях солидного строения их цитоплазма слабо базофильная, ядра крупные с чёткими контурами, зернистым хроматином и крупными 1-2 ядрышками. В полях зрения просматривались фигуры митоза и единичные клетки, погибающие путём апоптоза.

В перитуморальной зоне сосуды распределены неравномерно. От расширенных венул в подкожной клетчатке в паренхиму опухолей ответвлялись многочисленные капиллярные петли (рис. 4В). Периферия карциномы Эрлиха, особенно зоны ангиогенеза, инфильтрирована лимфоидными и круглоклеточными элементами (рис. 4Г).

Центральные области опухолевых узлов представлены сливными полями некротизированной ткани с очагами кровоизлияний. Вокруг сохранившихся сосудов присутствовали отдельные опухолевые «манжетки», а также очаги дистрофически изменённых опухолевых клеток. По периферии таких очагов и на границе с сохранившейся паренхимой просматривались полиморфноядерные лейкоциты, подвергающиеся распаду.

Рис. 4. Морфология карциномы Эрлиха в контроле на 25 сутки после перевивки. Окрашивание гематоксилином и эозином. А – гистологический рисунок опухоли при обзорном увеличении; Б – зона инвазии опухолевых клеток в подкожную клетчатку; В – ангиогенез в перитуморальной зоне; Г – инфильтрация перитуморальной зоны лимфоидными и круглоклеточными элементами. Увеличение: $\times 15$ (А); $\times 250$ (Б, Г); $\times 175$ (В).

Опытные группы. У мышей 1-й опытной группы на наружной поверхности левого бедра видны плотные струпы.

При микроскопическом исследовании тканей в зоне лазерного воздействия (рис. 5А) у животных этой группы – с полной регрессией карциномой – опухолевые клетки не выявлены. Очаги фотодеструкции заполнены разрастающейся соединительной тканью, фрагментами дистрофически изменённых мышечных волокон и круглоклеточными элементами (рис. 5Б). На границе с участками некроза соединительная ткань инфильтрирована многочисленными макрофагами и лейкоцитами. Погибшие мышечные волокна подвергались распаду и элиминировались макрофагами (рис. 5В). В зонах репаративной регенерации в соединительной и жировой тканях периваскулярно выявлялись обширные лимфоидные инфильтраты.

У мыши с объёмом опухоли в день ФДТ $0,11 \text{ см}^3$ через 3 недели выявлен повторный рост карциномы (рис. 5Г). По морфологическим характеристикам в этот период рецидивирующего роста КЭ опухолевые клетки мало отличались от соответствующего контроля. Однако обращала на себя особое внимание интенсивная инфильтрация соединительной ткани, замещающей погибшие ткани, и окружающей растущий опухолевый узелок с лимфоцитами, макрофагами, плазматическими клетками и нейтрофилами.

У животных 2-й опытной группы, выведенных из эксперимента на 21 сутки после ФДТ, на наружной поверхности левого бедра видны плотные струпы тёмного цвета. При гистологическом исследовании зон фотодинамического воздействия у мышей с регрессированными опухолями выявлена полная деструкция КЭ с её замещением фиброзной тканью (рис. 6А). Микроскопическая картина тканей в зоне облучения соответствовала ранее описанной для мышей 1-й опытной группы. Жировая ткань в подкожной клетчатке и участки регенерации повреждённых тканей инфильтрированы клетками лимфоидного и моноцитарно-макрофагального рядов (рис. 6Б). Вокруг погибших мышечных волокон видны многочисленные нейтрофилы и макрофаги (рис. 6В).

Рис. 5. Морфология карциномы Эрлиха у мыши первой опытной группы на 21-е сутки после ФДТ.

Окрашивание гематоксилином и эозином. А – зона деструкции опухоли; Б – замещение погибших структур соединительной тканью; В – элиминация погибшей ткани макрофагами; Г – рецидив опухоли. Увеличение: $\times 15$ (А, Г); $\times 125$ (Б); $\times 250$ (В).

Рис. 6. Микроскопическая картина карциномы Эрлиха в зоне лазерного воздействия у мыши второй опытной группы на 21 сутки после ФДТ.

Окрашивание гематоксилином и эозином. А – полная деструкция опухоли и её замещение плотной соединительной тканью; Б – инфильтрация участка регенерации повреждённых тканей клетками лимфоидного и моноцитарно-макрофагального рядов; В – нейтрофилы и макрофаги вокруг погибших мышечных волокон в зоне фотодеструкции; Г – монофокальный рецидив опухоли. Увеличение: $\times 15$ (А, Г); $\times 125$ (Б); $\times 250$ (В).

У двух мышей с объёмом опухолей в день ФДТ более $0,11 \text{ см}^3$ среди повреждённых тканей выявлен повторный рост опухолей. Центральная часть рецидивов карциномы выглядела кратерообразно некротизированной, а жизнеспособная паренхима просматривалась в виде разветвлённых тяжей по периферии опухолевого узла (рис. 6Г). Обращала на себя внимание инфильтрация перитуморальной зоны растущих опухолевых узелков лимфоцитами и нейтрофилами. В периферической зоне роста рецидивов были видны aberrantные митозы и более многочисленные, чем в контроле, клетки, погибающие путём апоптоза.

Заключение

После ФДТ карциномы Эрлиха мышей, проведённой в оптимальные сроки после введения липосомального борированного хлорина е6, противоопухолевый эффект получен во всех опытных группах животных (табл. 1). Максимальный ингибирующий эффект до 21 суток наблюдения (полная регрессия опухоли у 100% животных) получен при дозе ФС $1,25 \text{ мг/кг}$, плотности энергии 150 Дж/см^2 и плотности мощности $0,51 \text{ Вт/см}^2$ лазерного излучения. При микроскопическом исследовании тканей в зоне лазерного воздействия в данной группе только у одного животного, у которого визуально был определён регресс карциномы Эрлиха, при морфологическом исследовании был выявлен рецидив новообразования. На основании комплексного исследования можно сделать вывод о высокой противоопухолевой эффективности терапии с использованием липосомального борированного хлорина е6. Кроме того, патоморфологические исследования свидетельствуют, что на 21 сутки после терапии в области облучения лазером концентрируются скопления клеток: моноцитов, лимфоцитов, плазматических клеток и нейтрофилов. По-видимому, ФДТ с ФС липосомальным борированным хлорином е6 способствует развитию острого воспаления без токсического воздействия на нормальные ткани, привлекает клетки иммунной системы. Поэтому ФДТ может быть наиболее эффективным методом лечения рака, который приведёт к регрессии и эрадикации опухоли вследствие индукции противоопухолевого иммунитета.

Таблица 1

Показатели противоопухолевой эффективности ФДТ с внутривенным введением ФС липосомального борированного хлорина е6 в разных дозах и при различных параметрах воздействия лазерным излучением на карциному Эрлиха мышей (лазерный прибор «Аткус-2», плотность мощности $0,51 \text{ Вт/см}^2$)

№ группы	Доза ФС, плотность энергии облучения	Срок наблюдений, сутки				
		3	7	10	14	21
1	$1,25 \text{ мг/кг}$, 150 Дж/см^2	(3) 100				
2	$2,5 \text{ мг/кг}$, 100 Дж/см^2	(3) 100				$0,72 \pm 0,93^* (1)$ 91,3 (2) 66,7 (3)
Контроль		$2,10 \pm 0,47$	$5,10 \pm 0,85$	$6,46 \pm 1,49$	$11,89 \pm 1,48$	$23,11 \pm 5,61$

Примечание: 1 – коэффициент абсолютного прироста опухоли (К) у животных с продолженным ростом; 2 – торможение роста опухоли (ТРО, %); 3 – процент животных с полной регрессией опухоли (ПР); * $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Литература

1. **Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В.** Фотодинамическая терапия. М.: Изд. мед. информац. агентство, 2009. 212 с.
2. **Филоненко Е.В., Серова Л.Г.** Фотодинамическая терапия в клинической практике //Biomedical Photonics. 2016. Т. 5, № 2. С. 26-37.
3. **Странадко Е.Ф.** Основные этапы развития и современное состояние ФДТ в России //Лазерная медицина. 2012. № 2. С. 4-14.
4. **Бикбов Э.Н., Привалов В.А., Куренков Е.Л.** Динамика морфологических изменений в опухоли при ФДТ в эксперименте //Иероглиф. 2009. № 21. С. 41-59.
5. **Allison R.R., Moghiss K.** Photodynamic therapy: PDT mechanisms //Clin. Endosc. 2013. V. 46, N 1. P. 24-29.
6. **Южаков В.В., Романко Ю.С., Каплан М.А., Галкин В.Н., Мажуга А.Г., Грин М.А., Бурмистрова Н.В., Фомина Н.К., Бандурко Л.Н., Севаньяева Л.Е., Яковлева Н.Д., Ингель И.Э., Мозеров С.А., Старовойтова А.В.** Действие фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла *a* на рост и функциональную морфологию саркомы М-1 крыс //Альманах клинической медицины. 2017. Т. 45, № 4. С. 333-347. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-333-347.
7. **Южаков В.В., Бурмистрова Н.В., Фомина Н.К., Бандурко Л.Н., Севаньяева Л.Е., Старовойтова А.В., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Островерхов П.В., Каплан М.А., Грин М.А., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф., Галкин В.Н., Романко Ю.С.** Морфофункциональные характеристики саркомы М-1 крыс после фотодинамической терапии с производными бактериохлорофилла *a* //Biomedical photonics. 2016. Т. 5, № 4. С. 4-12.
8. **Филоненко Е.В.** Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия – обоснование применения и возможности в онкологии //Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. 2014. Т. 3, № 1. С. 3-7.
9. **Абакушина Е.В., Романко Ю.С., Каплан М.А., Каприн А.Д.** Противоопухолевый иммунный ответ и фотодинамическая терапия //Радиация и риск. 2014. Т. 23, № 4. С. 92-98.
10. **Лукьянец Е.А.** Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии //Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. 2013. Т. 2, № 3. С. 3-16.
11. **Nikitina R.G., Kaplan M.A., Olshevskaya V.A., Rodina J.S., Drozhzhina V.V., Morozova T.G.** Photodynamic therapy with boronated chlorin as a photosensitizer //J. Cancer Sci. Ther. 2011. V. 3, N 9. P. 216-219.
12. **Zhang J., Jiang C., Longo J.P.F., Azevedo R.B., Zhang H., Muehlmann L.A.** An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy //Acta Pharm. Sin. B. 2018. V. 8, N 2. P. 137-146. doi: 10.1016/j.apsb.2017.09.003.
13. **Райков А.О., Хашем А., Барышникова М.А.** Липосомы для направленной доставки противоопухолевых препаратов //Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 15, № 2. С. 90-96.
14. **Weijer R., Broekgaarden M., Kos M., van Vught R., Rauws E.A.J., Breukink E., van Gulik T.M., Storm G., Heger M.** Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery //J. Photochem. Photobiol C: Photochem. Rev. 2015. V. 23. P. 103-131.
15. **Muehlmann L.A., Joanitti G.A., Silva J.R., Longo J.P.F., Azevedo R.B.** Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy //Braz. J. Med. Biol. Res. 2011. V. 44, N 8. P. 729-737.
16. **Мачинская Е.А., Иванова-Радкевич В.И.** Обзор механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов различной химической структуры в опухолевой ткани //Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. 2013. Т. 2, № 4. С. 28-32.
17. **Круглякова А.А.** Особенности фармакокинетики липосомальных препаратов //Разработка и регистрация лекарственных средств. 2012. № 1. С. 37-40.

18. Лощенов В.Б., Линьков К.Г., Савельева Т.А., Лощенов М.В., Модель С.С., Бородин А.В. Аппаратурное и инструментальное обеспечение флуоресцентной диагностики и ФДТ //Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. 2013. Т. 2, № 3. С. 17-25.
19. Инжеваткин Е.В., Слепов Е.В., Савченко А.А. Связь продолжительности жизни мышей с асцитной карциномой Эрлиха с особенностями метаболизма лимфоцитов в динамике роста опухоли //Сложные системы в экстремальных условиях: Тез. докл. XV Всероссийского симпозиума с международным участием. Красноярск, 2010. С. 33-34.
20. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. Часть 1. С. 640-670.

Study of efficiency of photodynamic therapy of Earlich carcinoma mice with intravenous introduction of photosensitizer of liposomal boronated chlorine e6

Burmistrova N.V., Drozhzhina V.V., Kaplan M.A., Yuzhakov V.V., Bandurko L.N.,
Tsyganova M.G., Ivanov S.A., Arkhipova L.M., Abramova O.B.

A. Tsyb MRRC, Obninsk

The article is devoted to the study of the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) with the use of new Russian photosensitizer (PS) of liposomal boronated chlorin e6 after its intravenous injection. As an experimental model of the tumor, Ehrlich carcinoma of mice was studied. The aim of the study was to study the effectiveness of PDT with the use of liposomal boronated chlorin e6 as PS. To determine the optimal time for laser irradiation, the kinetics of the distribution of PS in tumor and healthy thigh tissues was studied. The effectiveness of therapy was assessed by the number of animals with complete tumor regression (CR%), by inhibition of tumor growth (TGI%) and by the absolute growth rate (K) in animals with continued tumor growth compared with the control. Control mice were tumor carriers without exposure. The therapeutic potential of PDT for the devitalization of tumor cells was verified by histological studies. It was found that after PDT, which was carried out at the optimal time after the injection of PS, complete tumor regression was observed in 100% of the animals before 21 days of the study at a dose of PS of 1.25 mg/kg, at energy density of 150 J/cm² and a power density of 0.51 W/cm² laser radiation. When microscopic examination of tissues in the laser exposure zone, only one animal with visually regressed Ehrlich carcinoma was found to have a relapse of the neoplasm.

Key words: photodynamic therapy, Ehrlich carcinoma, mice, liposomal boronated chlorin e6, photosensitizer accumulation dynamics, contrast index, laser, tumor regression, pathomorphology.

References

1. Tsyb A.F., Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V. *Photodynamic therapy*. Moscow, Medical Information Agency, 2009. 212 p. (In Russian).
2. Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice. *Biomedical Photonics*, 2016, vol. 5, no. 2, pp. 26-37. (In Russian).
3. Stranadko E.P. The main stages of development and the current state of PDT in Russia. *Lazernaya meditsina – Laser medicine*, 2012, no. 2, pp. 4-14. (In Russian).
4. Bikbov E.N., Privalov V.A., Kurenkov E.L. Dynamics of morphological changes in tumors with PDT in the experiment. *Ieroglif – Hieroglyph*, 2009, no. 1, pp. 41-59. (In Russian).
5. Allison R.R., Moghissi K. Photodynamic Therapy: PDT mechanisms. *Clin. Endos.*, 2013, vol. 46, no. 1, pp. 24-29.

Burmistrova N.V. – Head of Lab., C. Sc., Med.; Drozhzhina V.V.* – Researcher, Kaplan M.A. – Head of Dep., MD, Prof.; Yuzhakov V.V. – Head of Lab., C. Sc., Med.; Bandurko L.N. – Lead. Researcher, C. Sc., Med.; Tsyganova M.G. – Researcher; Ivanov S.A. – Director, MD, Prof.; Arkhipova L.M. – Research Assistant; Abramova O.B. – Researcher. A. Tsyb MRRC.

*Contacts: 4 Korolyov str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249035. Tel.: + 7 (903) 524-53-13; e-mail: drozhzhina_1949@mail.ru.

6. Yuzhakov V.V., Romanko Yu.S., Kaplan M.A., Galkin V.N., Mazhuga A.G., Green M.A., Burmistrova N.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Sevyakhaeva L.E., Yakovleva N.D., Ingel I.E., Moserov S.A., Starovoytova A.V. The effect of photodynamic therapy with bacteriochlorophyll a derivative on the growth and functional morphology of sarcoma M-1 rats. *Al'manakh klinicheskoy mediciny – Clinical Medicine Almanac*, 2017, vol. 45, no. 4, pp. 333-347. doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-333-347. (In Russian).
7. Yuzhakov V.V., Burmistrova N.V., Fomina N.K., Bandurko L.N., Sevanjkaeva L.E., Starovoytova A.V., Yakovleva N.D., Tsyganova M.G., Ingel I.E., Ostroverkhov P.V., Kaplan M.A., Grin M.A., Mazhuga A.G., Mironov A.F., Galkin V.N., Romanko Yu.S. Morphofunctional characteristics of arterial sarcoma M-1 after photodynamic therapy with bacteriochlorophyll derivatives a. *Biomedical Photonics*, 2016, vol. 5, no. 4, pp. 4-12. (In Russian).
8. Filonenko E.V. Fluorescent diagnostics and photodynamic therapy – justification of application and possibilities in oncology. *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika – Photodynamic Therapy and Photodiagnosis*, 2014, vol. 3, no. 1, pp. 3-7. (In Russian).
9. Abakushina E.V., Romanko Yu.S., Kaplan M.A., Kaprin A.D. Antitumor immune response and photodynamic therapy. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2014, vol. 23, no. 4, pp. 92-98. (In Russian).
10. Lukiyants E.A. Search for new photosensitizers in photodynamic therapy. *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika – Photodynamic Therapy and Photodiagnosis*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 3-16. (In Russian).
11. Nikitina R.G., Kaplan M.A., Olshevskaya V.A., Rodina J.S., Drozhzhina V.V., Morozova T.G. Photodynamic therapy with boronated chlorin as a photosensitizer. *J. Cancer Sci. Ther.*, 2011, vol. 3, no. 9, pp. 216-219.
12. Zhang J., Jiang C., Longo J.P.F., Azevedo R.B., Zhang H., Muehlmann L.A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm. Sin. B*, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 137-146. doi: 10.1016/j.apsb.2017.09.003.
13. Raikov A.O., Hashem A., Baryshnikova M.A. Liposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Rossiyskij bioterapevticheskij zhurnal – Russian Journal of Biotherapy*, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 90-96. (In Russian).
14. Weijer R., Broekgaarden M., Kos M., van Vught R., Rauws E.A.J., Breukink E., van Gulik T.M., Storm G., Heger M. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, 2015, vol. 23, pp. 103-131.
15. Muehlmann L.A., Joanitti G.A., Silva J.R., Longo J.P.F., Azevedo R.B. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2011, vol. 44, no. 8, pp. 729-737.
16. Machinskaya E.A., Ivanova-Radkevich V.I. Review of selective accumulation of photosensitizers with different chemical structure in tumor tissue. *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika – Photodynamic Therapy and Photodiagnosis*, 2013, vol. 2, no. 4, pp. 28-32. (In Russian).
17. Kruglyakova A.A. Features of pharmacokinetics of liposomal drugs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv – Development and Registration of Medicines*, 2012, no. 1, pp. 37-40. (In Russian).
18. Loschenov V.B., Linkov K.G., Savelieva T.A., Loschenov M.V., Model S.S., Borodkin A.V. Hardware and tool equipment for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy. *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika – Photodynamic Therapy and Photodiagnosis*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 17-25. (In Russian).
19. Inzhevatkin E.V., Slepov E.V., Savchenko A.A. Relationship between the lifespan of mice with as cites carcinoma of Ehrlich with the features of lymphocyte metabolism in tumor growth dynamics. *Slozhnye sistemy v ekstremal'nykh usloviyakh: Tez. dokl. XV Vserossiyskogo simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiem – Complex Systems in Extreme Conditions: Abstracts. XV Symposium with International Participation*. Krasnoyarsk, 2010, pp. 33-34. (In Russian).
20. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [A guide to preclinical drug research]. Moscow, Grief and K, 2012, Part 1, pp. 640-670.